

PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



09/830741

Bescheinigung

EP99/8181

| | |
|-------------------|-----|
| REC'D 27 MAR 2000 | |
| WIPO | PCT |

Die Bayer Aktiengesellschaft in Leverkusen/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Phosphinat-Peptidanaloga zur Behandlung von fibrotischen
Eikrankungen"

am 30. Oktober 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig das Symbol
A 61 K 38/05 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 23. August 1999

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Aktenzeichen: 198 50 072.6

Keller

Phosphinat-Peptidanaloga zur Behandlung von fibrotischen Erkrankungen

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Phosphinat-Peptidanaloga als Inhibitoren
5 der Procollagen-C-Proteinase (PCP) zur Behandlung fibrotischer Erkrankungen.

Es ist bekannt, daß die Procollagen-C-Proteinase (PCP) ein Schlüsselenzym der
Fibrogenese ist. Sie katalysiert die hydrolytische Abspaltung der Procollagen-
propeptide von den Procollagenen I, II, III und IV sowie Laminin V [vgl. Amano S,
10 Takahara K; Gerecke D, Nishiyama T, Lee S, Greenspan DS, Burgeson RE (1996)
Bone morphogenetic protein-1 is the processing enzyme for laminin 5 in human
keratinocytes. Mol. Biol. Cell 7 (suppl.) 58A]. Somit ist die PCP ein Schlüsselenzym
der Collagenprozessierung [vgl. Olsen BJ (1996) Morphogenesis: collagen it takes
and bone it makes. Curr. Biol. 6: 645-647]. In BMP-I-knock-out-Mäusen wurde
15 nachgewiesen, daß eine komplette Abwesenheit der PCP zu einer unvollständigen
Collagenprozessierung mit der Ablagerung von atypischen, lockeren Collagen-
fibrillen führt [vgl. Suzuki N, Labosky PA, Furata Y, Hargett I, Dunn R, Fogo AB,
Takahara K, Peters DM, Greenspan DS, Hogan BL (1996) Failure of ventral body
wall closure in mouse embryos lacking a procollagen C-proteinase encoded by BMP-
20 1, a mammalian gene related to Drosophila tolloid. Development 122: 3587-3595] .

Die PCP ist wahrscheinlich auch für die hydrolytische Abspaltung der Propeptid-
sequenz der Lysyloxidase verantwortlich. Wahrscheinlich führt die Abspaltung der
Prosequenz zur Aktivierung der katalytischen Lysyloxidaseaktivität der maturen
25 Form [vgl. Pachenko MV, Stetler-Stevenson WG, Trubetskoy OV, Gacheru SN,
Kagan HM (1996) Metalloproteinase activity secreted by fibrogenic cells in the pro-
cessing of prolysyl oxidase. Potential role of procollagen C-proteinase. J. Biol.
Chem. 271: 7113-7119]. Aktive Lysyloxidase verknüpft gegenüberliegende Colla-
genfibrillen kovalent miteinander. Auf diese Weise wird die biologische Stabilität
30 des Collagens gegenüber dem Abbau durch Collagenasen indirekt auch durch die
PCP erhöht.

Die PCP oder eng verwandte Proteine scheinen auch bei der Freisetzung von TGF β -artigen Wachstumsfaktoren eine Rolle zu spielen. Durch neue Arbeiten konnte gezeigt werden, daß PCP-ähnliche Proteasen TGF β -artige Wachstumsfaktoren aus einem inaktiven Komplex mit TGF β -Bindungsproteinen herauslösen können [vgl. Kessler E, Takahara K, Biniaminow L, Brusel M, Greenspan DS (1996) Bone morphogenetic protein-1: The type I procollagen C-proteinase]. Dabei wird der Bindungspartner der TGF β -artigen Wachstumsfaktoren durch spezifische Proteolyse zersetzt. Indirekt besitzt die PCP also möglicherweise auch eine TGF β -agonistische Aktivität. Daher kann der PCP eine entscheidende Rolle in der Fibrogenese zugesprochen werden.

Die PCP-Aktivität geht auf Splicevarianten des BMP-I-Gens zurück [vgl. Kessler E, Takahara K, Biniaminow L, Brusel M, Greenspan DS (1996) Bone morphogenetic protein-1: The type I procollagen C-proteinase; Reddi AH (1996) BMP-1: Resurrection as procollagen C-proteinase. Science 217: 463; Li SW, Sieron AL, Fertala A, Hojima Y, Arnold WV, Prockop DJ (1996) The C-proteinase that processes procollagens to fibrillar collagens is identical to the protein previously identified as bone-morphogenetic protein-1. Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 5127-5130]. Bislang wurden verschiedene Splicevarianten dieses Proteins identifiziert, deren biologische Funktion zum Teil unklar ist. Bislang ist gesichert, daß die Splicevarianten BMP I-I und BMP I-III (tld-Variante) Procollagen und Pro-Lysyloxidase spezifisch schneiden können. Durch neuere Arbeiten wurden weitere BMP-1-Splicevarianten identifiziert, deren biologische Funktion und Substratspezifität aber zum Teil noch ungeklärt ist [vgl. Janitz M, Heiser V, Böttcher U, Landt O, Lauster R (1998) Three alternatively spliced variants of the gene coding for the human bone morphogenetic protein-1. J. Mol. Med. 76: 141-146].

Obwohl die Expressionsclonierung und Aufreinigung der PCP bisher nur in kleinen Ausbeuten gelungen ist, sind von dem Enzym zahlreiche strukturelle Details bekannt. Die PCP gehört nämlich zur Familie der Astacinproteasen, und die Kristallstruktur

dieses Proteins ist im Detail bekannt. Zwischen der katalytischen Domäne von BMP-I und Astacin gibt es einen sehr hohen Grad an struktureller Homologie, so daß es möglich war, vielen Aminosäuren der PCP-Proteasedomäne aufgrund dieser Homologie die wahrscheinliche strukturelle und biochemische Funktion zuzuordnen [vgl. 5 Stöcker W, Gomis-Rüth FX, Bode W, Zwillig R (1993) Implications of the three-dimensional structure of astacin for the structure and function of the astacin family of zinc-endopeptidases. Eur. J. Biochem. 214: 215-231].

Durch computergesteuertes "Molecular Modelling" konnte in der Vergangenheit die 10 Substratbindung an das aktive Zentrum der Astacine im molekularen Detail hergeleitet werden [vgl. Stöcker W, Grams F, Baumann U, Reinemer P, Gomis-Rüth FX, McKay DB, Bode W (1995) The metzincins – Topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-endopeptidases. Prot. Sci.: 823-840]. Diese Arbeiten 15 führten zum "rational design" von Phosphinat-Peptidanaloga, die das Astacin mit hoher Wirkpotenz inhibieren. Der Komplex zwischen einem Phosphinatinhibitor und Astacin wurde strukturell aufgeklärt [vgl. Grams F, Dive V, Yiotakis A, Yiallourous I, Vassilou S, Zwillig R, Bode W, Stöcker W (1996) Structure of astcin with transition-state analogue inhibitor. Nature Struct. Biol. 3: 671-675].

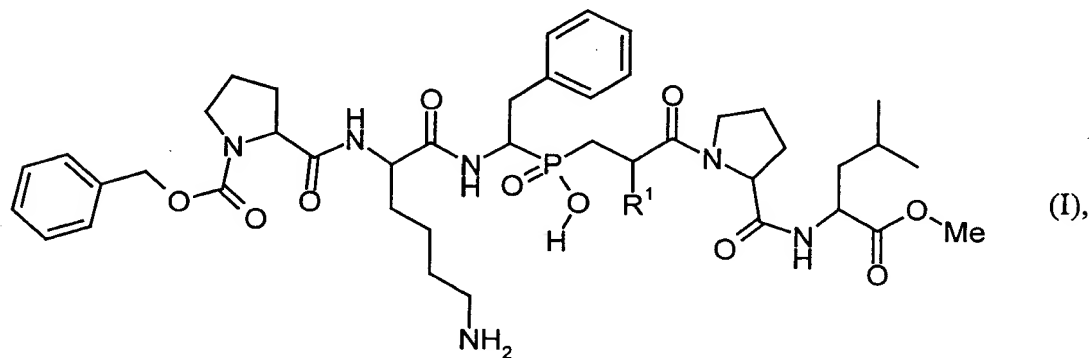
20 Bisher wurde trotz der hohen strukturellen Homologie zwischen Astacin und der katalytischen Domäne von BMP-1 davon ausgegangen, daß die beiden Proteasen sich aufgrund biochemischer Unterschiede hinsichtlich ihres Reaktionsverhaltens auch in der Hemmbarkeit durch Proteaseinhibitoren deutlich unterscheiden. Biochemische 25 Unterschiede zwischen Astacin und BMP-I bestehen z.B. hinsichtlich der Substratspezifität (Astacin hydrolysiert als Verdauungsenzym des Flußkrebsses relativ unspezifisch kollagenartige Proteine, während die PCP hochspezifisch an nur einer Stelle im Procollagenmolekül und in der Pro-Lysyloxidase schneidet).

30 In der Literatur sind bisher nur niederpotente Inhibitoren der PCP beschrieben, denen eine antifibrotische Wirkung zugeschrieben wird [vgl. Brenner M, Ho WB (1996) C-

proteinase inhibitors for the treatment of disorders related to the overproduction of collagen. WO 97/05865]

Überraschenderweise wurde jetzt gefunden, daß Phosphinatpeptidanaloga der allgemeinen Formel (I),

5



in welcher

10 R^1 für Wasserstoff oder Methyl steht,

und deren Salze und Isomere die PCP mit sehr hoher Wirkpotenz inhibieren und deshalb zur Behandlung und Prophylaxe von fibrotischen Erkrankungen verwendet werden können.

5

20

Im Rahmen der Erfindung sind physiologisch unbedenkliche Salze bevorzugt. Physiologisch unbedenkliche Salze sind im allgemeinen Salze der erfindungsgemäßen Verbindungen mit anorganischen oder organischen Säuren. Bevorzugt werden Salze mit anorganischen Säuren, wie Salzsäure, Bromwasserstoffsäure, Phosphorsäure oder Schwefelsäure oder Salze mit organischen Carbon- oder Sulfonsäuren, wie Essigsäure, Maleinsäure, Fumarsäure, Äpfelsäure, Zitronensäure, Weinsäure, Milchsäure, Benzoesäure, oder Methansulfonsäure, Ethansulfonsäure, Phenylsulfonsäure, Toluolsulfonsäure oder Naphthalindisulfonsäure.

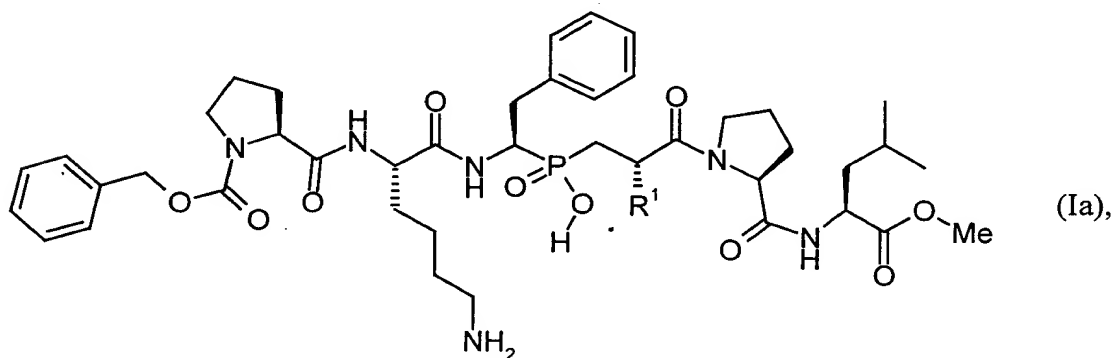
Die erfindungsgemäßen Verbindungen können in stereoisomeren Formen existieren, die sich entweder wie Bild und Spiegelbild (Enantiomere), oder die sich nicht wie Bild und Spiegelbild (Diastereomere) verhalten. Die Erfindung betrifft sowohl die Antipoden als auch die Racemformen sowie die Diastereomeregemische.

5

Die Verbindungen der allgemeinen Formel (I) können in allen enantiomeren und diastereomeren Formen vorliegen. Bevorzugt sind diejenigen Isomeren, in denen die aus Prolin, Lysin und Leucin gebildeten Molekülteile die L-Konfiguration besitzen, ebenso wie deren Salze und Prodrugs.

10

Besonders bevorzugt werden Phosphinatpeptidanalogue der allgemeinen Formel (I) mit aufgezeigter Konfiguration



5

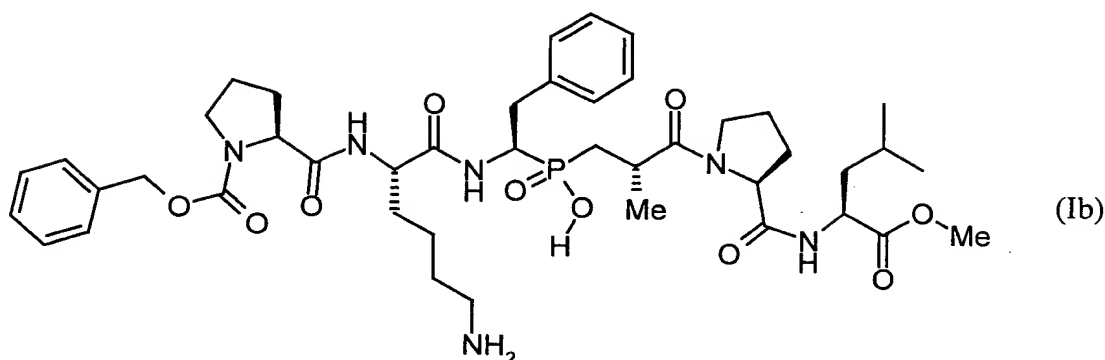
in welcher

R^1 für Wasserstoff oder Methyl steht,

und deren Salze und Isomere zur Behandlung und Prophylaxe von fibrotischen Erkrankungen verwendet..

20

Ganz besonders bevorzugt wird die Verbindung der allgemeinen Formel (Ib)



im folgenden als **Z---PKF(PC)APL---O-Me** bezeichnet,

deren Enantiomere und deren Salze zur Behandlung und Prophylaxe von fibrotischen Erkrankungen verwendet.

Die Verbindungen der allgemeinen Formel (I) sind bekannt und können nach üblichen Methoden der Peptidsynthese aus entsprechenden Phinioylverbindungen hergestellt werden [vgl. hierzu Yiotakis A, Vassilio S, Jiracek J, Dive V (1996) Protection of the Hydroxyphosphinyl Function of Phosphinic Dipeptides by Adamantyl. Application to the Solid-Phase Synthesis of Phosphinic Peptides. J. Org. Chem. 61: 6601-6605; Campagne JM, Coste J, Guillou L, Heitz A, Jouin P (1993) Solid phase synthesis of phosphinic peptides. Tetrahedron Lett. 34: 4181-4184].

Die Ergebnisse waren unerwartet, weil sich BMP-I, Meprin und Astacin vor allem im sogenannten SI'-Loop unterscheiden. Ein Ausschnitt aus diesem Loop ist hier dargestellt:

| | |
|----------|-----------|
| Astacin: | T--DPYD |
| BMP-I: | KPPIG-Q |
| Meprin: | I -- IG-Q |

Dieser Loop bildet den essentiellen Teil der SI'-Bindungstasche der Astacin-ähnlichen Proteasen. Hier liegt, wie am Beispiel des Astacins und des Meprins gezeigt

wurde, der Schlüssel zur unterschiedlichen Substrat- und Inhibitorspezifität beider Enzyme. In der SI'-Tasche unterscheiden sich Meprin und Astacin sehr deutlich. Die PCP hat zusätzlich zwei Prolinreste und einen Lysinrest in dieser Region. Wie durch Computermodelling der Proteasedomäne der PCP gezeigt werden konnte, ist der Lysinrest sehr wahrscheinlich an der Bindung der Carboxylgruppe in der Seitenkette des Aspartats in P1' neben der Spaltstelle im Procollagen beteiligt. Die Prolinreste liegen nach dem Modell in der cis-Konfiguration vor und sind eine Eigentümlichkeit der BMP-I-Subfamilie unter den Astacinen. Im Gegensatz dazu spaltet Astacin nicht neben sauren Resten. Aus diesen Gründen war es völlig unerwartet, daß sich ein für die Inhibition von Astacin entworfenes Phosphinat [vgl. Yiallourous I, Vassiliou S, Yiotakis A, Zwilling R, Stöcker W, Dive V (1998) Phosphinic peptides, the first potent inhibitors of astacin, behave as extremely slow-binding inhibitors. Biochem. J. 331: 375-379] als effektiver PCP-Hemmstoff erwies.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen der allgemeinen Formel (I) zeigen ein nicht vorhersehbares, wertvolles pharmakologisches Wirkspektrum.

Überraschenderweise zeichnen sich die erfindungsgemäßen Verbindungen durch eine sehr hohe Wirkpotenz bei der Inhibition der PCP aus.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen sind deshalb zur Behandlung von Leberfibrosen jeder Genese und von Fibrosen mit anderer Organmanifestation geeignet.

Dazu gehören diverse Gruppen von Krankheiten, die mit einer qualitativ veränderten Collagenproduktion oder mit einer verstärkten Ablagerung von Collagen im Extracellulärraum einhergehen, wie Leberfibrosen unterschiedlichen Ursprungs, wie z.B. alkoholische Leberzirrhose, biliäre Zirrhose, Hepatitiden viraler oder anderer Genese, idiopathische interstitielle Fibrosen, idiopathische Lungenfibrosen, akute pulmonale Fibrosen, das "acute respiratory distress syndrome" (ARDS), perimuskuläre Fibrosen, perizentrale Fibrosen, Dermatofibrome, Nierenfibrosen, die diabetische Nephropathie, Glomerulonephritiden, die systemische oder lokale Sklerodermie, Keloide,

die hypertrophe Narbenbildung, Gelenkadhäsionen, Arthrosen, Myelofibrosen, Vernarbungen der Cornea, die cystische Fibrose, muskuläre Fibrosen, die Duchenne'sche Muskeldystrophie, Ösophagusstrikturen, Morbus Ormond, Morbus Crohn, Colitis ulcerosa und Aneurysmen der großen Gefäße.

5

Außerdem umfaßt die Erfindung fibrotische Erkrankungen, die initiiert oder hervorgerufen werden durch chirurgische Narbenrevisionen, plastische Chirurgie, Glaukome, Kataraktfibrosen, Vernarbungen der Cornea, die sogenannte "graft versus host disease", chirurgische Eingriffe an Sehnen, Nerveneinklemmungssyndrome, die Dupuytren'sche Kontraktur, Adhäsionen infolge gynäkologischer Eingriffe, pelvische Adhäsionen, peridurale Fibrosen, Erkrankungen der Schilddrüse oder der Nebenschilddrüsen, durch metastatischen Knochenbefall, durch das multiple Myelom oder durch Restenosen.

10

15

Nachweis der PCP-Aktivität im Fluoreszenzdequenchtest

Zum Nachweis der PCP-Aktivität wurde ein synthetisches Dekapeptidsubstrat mit der Sequenz

20

DABCYL - Asp - Phe - Tyr - Arg - Ala - Asp - Gen - Pro - Arg - Asp (EDANS) - NH₂

25

durch Zusatz von PCP gespalten. Diese Peptidfrequenz entspricht der Region im Procollagen α_2 (I), die von PCP gespalten wird. Die Spaltsequenz ist biochemischen Experten bekannt [vgl. Lee ST; Kessler E, Greenspan DS (1990) Analysis of site-directed mutations in human pro- α_2 (I) collagen which block cleavage by the C-proteinase. J. Biol. Chem. 265: 21992-21996], ebenso das Verfahren des Dequench-tests [vgl. Matayoshi ED, Wang GT, Krafft GA, Erickson J (1989) Novel fluorogenic substrates for assaying retroviral proteases by resonance energy transfer. Science 247: 954-958].

30

Die Konzentration des synthetischen Peptids war 5.6 μM , die finalen Pufferbedingungen waren: 50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl und 0,005 % Brij35.

Die Durchführung des kinetischen Test erfolgte wie im folgenden beschrieben: Das Fluoreszenzsubstrat wurde in 90 μl Reaktionspuffer gelöst. Die Kinetik des Substratumsatzes durch MMP-2 wurde in Doppelbestimmungen durch Fluoreszenzmessung (Ex. 365 nm/Em. 450 nm) zwischen 0 bis 120 min detektiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe einer geeigneten Aktivität von PCP, in 10 μl Reaktionspuffer gelöst, gestartet. In Zeitintervallen von anfangs 5min und später in größeren Zeitintervallen wurde die Emission als ein Maß der proteolytischen Aktivität gemessen. Als Negativkontrolle wurde der spontane Zerfall des Fluoreszenzsubstrats bei Zugabe von Reaktionspuffer ohne PCP-Aktivität gemessen. Die Fluoreszenzmessungen erfolgten über einen Zeitraum von ca. 4h bei 37°C. Nach Ablauf der Reaktion wurde das Substrat durch Zugabe von Proteinase K (Boehringer Mannheim, 1,44 μg /Reaktionsansatz, gelöst in 10 μl PBS) und Inkubation bei 37°C für 20 min vollständig zersetzt. Die Vollständigkeit der Hydrolyse wurde dadurch gezeigt, daß keine Zunahme der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zeit mehr erfolgte.

Der relative Substratumsatz in % der Gesamtmenge errechnete sich aus:

$$\% \text{ Umsatz} = (\mathbf{F_t} - \mathbf{F_{-t}}) \div (\mathbf{F_{total}} - \mathbf{F_{ini}}) \times 100\%$$

wobei $\mathbf{F_t}$ die relative Fluoreszenz nach einem Zeitintervall t unter Inkubation mit PCP ist. $\mathbf{F_{-t}}$ ist die korrespondierende relative Fluoreszenz nach dem Zeitintervall t ohne PCP-Zusatz, $\mathbf{F_{total}}$ ist die Fluoreszenz nach Totalhydrolyse durch Zusatz von Proteinase K, und $\mathbf{F_{ini}}$ ist die initiale relative Fluoreszenz vor Start der Reaktion durch Zugabe von Proteinase K.

In dem Test wurde die verwendete PCP-Aktivität typischerweise so eingestellt, daß mit ininhibiertem Enzym innerhalb des Meßzeitraumes ca. 20 % des Substrats umgesetzt wurden.

In Abbildung 1 ist eine typische Reaktionskinetik (% Umsatz) unter Zugabe des Phosphatininhibitors Z---PKF(PC)APC---O-Me dargestellt.

5 Die prozentuale Inhibition unter Zugabe der Inhibitoren errechnete sich nach:

$$\% \text{ Inhibition} = 100\% \times \% \text{ Umsatz (mit Inhibitor)} \div \% \text{ Umsatz (ohne Inhibitor)}$$

10

In Abbildung 2 wird die Konzentrations-Wirkungsbeziehung eines Phosphatininhibitors dargestellt.

Rekombinante Herstellung der katalytischen Domäne von BMP-I

Im Fluoreszenzaktivitätstest wurde die katalytische Domäne von BMP-I eingesetzt.
15 Die entsprechende cDNA-Sequenz ist aus der Literatur bekannt [vgl. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA (1988) Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. Science 242: 1528-1534] und wurde durch RT-PCR erhalten. Die entsprechenden Primers enthielten upstream eine *Ecl*XI und downstream eine *Sal*I-Schnittstelle, so daß das
20 Insert gemäß den Angaben des Herstellers Biometra [vgl. Instruction manual strep tag II system, Biometra 1994] in den *E. coli*-Expressionsvektor pASK75 inseriert werden konnte. Dies geschah durch einen Verdau des Plasmids pASK75 mit den Restriktionsenzymen *Bsa*I und *Sal*I. Diese Schnittstellen sind Bestandteile der "multiple cloning site" von pASK75. Die Details dieser Clonierungsschnitte sind
25 molekularbiologischen Experten aus der Literatur bekannt [vgl. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press].

30 Die Besonderheit dieses Clonierungsansatzes liegt darin, daß die Proteasedomäne ohne zwischengeschaltete Aminosäuren auf die Prosequenz des "outer membrane protein A" (ompA) folgt. Da die Prosequenz von ompA bei der Sekretion ins

Periplasma proteolytisch abgespalten wird, wird bei erfolgreicher periplasmatischer Sekretion der N-Terminus der katalytischen Domäne von BMP-I freigelegt. Es ist bekannt, daß der N-Terminus bei Proteasen aus der Astacinfamilie eine besondere Rolle bei deren Aktivierung spielt. Er faltet sich nämlich ins aktive Zentrum des Enzyms zurück und bildet so über Wasserstoffbrückenbindungen die stabile aktive Konformation des Enzyms aus.

Die Expression der Proteasedomäne von BMP-I wird durch zwei Faktoren erschwert:

1. Das Protein neigt zur Bildung von schwer löslichen *inclusion bodies*. Dies zeigt sich z.B. dadurch, daß in den meisten *E. coli*-Stämmen bei der Expression dieses Proteins keine löslichen Formen gefunden wurden. Außerdem ist die Verweildauer des rekombinanten Proteins im Cytoplasma wahrscheinlich sehr kurz, so daß bei seiner Expression regelmäßig das N-terminale Methionin nicht abgespalten wird. Somit ist es häufig schwierig, den freien N-Terminus zu rekonstituieren, der für die Herstellung der enzymatischen Aktivität der Proteasedomäne notwendig ist.
2. Das aktive Protein ist für *E. coli* toxisch, so daß die Expression von ATG-Vektoren in den meisten Stämmen zu schlechten oder überhaupt keinen Ausbeuten an rekombinantem Protein führt.

Bisher sind nur wenige Literaturstellen bekannt, in denen über die erfolgreiche rekombinante Expression des Proteins berichtet wird. Die beschriebenen Ausbeuten sind jeweils sehr gering. In Verbindung mit der niedrigen Wechselzahl der PCP (6 h⁻¹) [vgl. Prockop DJ, Sieron AL, Li SW (1998) Procollagen N-proteinase and procollagen C-proteinase. Two unusual metalloproteinases that are essential for procollagen processing probably have important roles in development and cell signaling. Matrix Biol. 16: 399-408] wird klar, weshalb bisher erst wenige potente Inhibitoren der PCP beschrieben wurden.

Für die Testung und Findung von PCP-Inhibitoren ist die Herstellung größerer Aktivitäten an PCP unerlässlich. Dieses Problem wurde mit dem oben beschriebenen Konstrukt gelöst. Durch die periplasmatische Sekretion des Proteins wird die cytoplasmatische Toxizität gemindert, zumal die PCP erst beim Übertritt ins Periplasma durch die ompA-spaltende Protease aktiviert wird. Die exzessive inclusion body-Bildung kann durch Absenkung der Reaktionstemperatur gemäß den Empfehlungen aus dem Protokoll des Herstellers und durch die Auswahl eines geeigneten Expressionsstamms erreicht werden.

Spezifitätsnachweis der PCP-Inhibitoren durch Untersuchung an der Matrix-Metalloprotease Typ 2 (MMP2) *in vitro*

MMP-2 (72 kD Type IV Collagenase, Gelatinase A) gehört zur Familie der Matrix-metalloproteasen, die in der Lage sind, Bestandteile der extrazellulären Matrix (Elastin, Fibronectin, Kollagene Typ IV, VII und X in helikalen Domänen und Gelantine) abzubauen [vgl. Aimes, RT & Quigley JP (1995) Matrix Metalloprotease-2 is an interstitial Collagenase-Inhibitor-free enzyme that catalyzes the cleavage of collagen fibrills and soluble native type-I collagen generating the specific $\frac{3}{4}$ -length and $\frac{1}{4}$ -length fragments, J. Biol. Chem., 270: 5872-5876]. Das Enzym wird als inaktive Vorstufe (72 kD) von zahlreichen Zellen mesenchymalen Ursprungs sezerniert. Zur Bildung der aktiven 62 kD-Form wird *in vivo* ein aminoterminals Propeptid abgespalten. Im nachfolgend beschriebenen Enzymassay (*in vitro*) wurde durch p-Aminophenyl-Quecksilberacetat (APMA) die latente in die aktive Form überführt.

Aktivierung: 1 U MMP-2 (Boehringer Mannheim, isoliert aus humanen Fibrosarcoma-Zellen, 200 U/mg) wurde in 50 mM Tris/Cl pH 7,5, 0.05 % (v/v) Triton X 100, 1 mM CaCl₂ mit 2.5 mM APMA 30 Minuten bei 37°C aktiviert [vgl. Gregory A. Grant, Arthur Z. Eiseb, Barry L. Marmer, William T. Roswit, and Gregory I. Goldberg (1987) The Activation of Human Fibroblast Procollagenase. J. Biol. Chem. 262: 5886-5889].

Enzymassay: In einem Volumen von 195 μL wurden 0,5 U aktivierte MMP-2 mit 1 μM Z---PKF(PC)APC---O-Me 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 5 μl Substrat (final 50 μM) ((Dnp-Pro- β -cyclohexyl-Ala-Gly-Cys(Me)-His-Ala-Lys(N-Me-Abz)-NH₂), Bachem AG, wurde die enzymatische Reaktion gestartet [vgl. Bickett DM, Green MD, Berman J, Dezube M, Howe AS, Brown PJ, Roth JT, McGeehan GM (1993) A high throughput fluorogenic substrate for interstitial collagenase (MMP-1) and gelatinase (MMP-9). *Anal Biochem.* 212: 58-64]. Die Emmision wurde als ein Maß der protolytischen Enzymaktivität von MMP-2 durch Fluoreszenzmessung (Excitationswellenlänge 365 nm und initiale Emission bei 538 nm) in Zeitintervallen zwischen 0 bis 120 min detektiert. Die Spaltsequenz ist biochemischen Experten bekannt [vgl. Lee ST; Kessler E, Greenspan DS (1990) Analysis of site-directed mutations in human pro- α_2 (I) collagen which block cleavage by the C-proteinase. *J. Biol. Chem.* 265: 21992-21996], ebenso das Verfahren des Dequenchtests [vgl. Matayoshi ED, Wang GT, Krafft GA, Erickson J (1989) Novel fluorogenic substrates for assaying retroviral proteases by resonance energy transfer. *Science* 247: 954-958].

Folgende Reaktionsansätze wurden durchgeführt: Als Negativkontrolle diente der spontane Zerfall des Substrates ohne MMP-2. Nicht aktivierte MMP-2, bzw. durch APMA aktivierte MMP-2, diente als Referenz zur aktivierten MMP-2 inkubiert mit 1 μM Z---PKF(PC)APC---O-Me (Abbildung 2).

Abbildung 2 zeigt klar die Spezifität des hochwirksamen Phosphinat-Peptidanalogen Z---PKF(PC)APC---O-Me zu PCB. Die verwendete aktivierte Matrix-Metall-oprotease Typ 2 wird auch bei Konzentrationen bis zu 1 μM (dosisabhängig) nur unwesentlich bei der Umsetzung des fluoreszenzmarkierten Peptids inhibiert.

Demonstration der biologischen Wirksamkeit

Die biologische Wirksamkeit der Substanzen kann in Zellkulturassays und *in vivo* demonstriert werden. Nach Applikation der Inhibitoren kann in humanen Zelllinien z.B. der Abfall der Konzentration an freiem Procollagen α_1 (III) Propeptid in den
5 Überständen gemessen werden, weil dieses Peptid durch die Aktivität der PCP freigesetzt wird. Zur Messung der PIIICP-Konzentrationen im Überstand kann ein kürzlich etablierter Assay verwendet werden [vgl. Burchardt ER, Schröder W, Heke M, Kohlmeyer J, Neumann R, Kroll W (1997) Expression cloning of C-terminal procollagen (III) propeptide and its use in a novel serum assay to monitor liver fibrogenesis. Hepatology 26: 487A].
10

Zum Nachweis des antifibrotischen Effekts der Substanzen in der Leber können z.B. das Tiermodell der akuten [vgl. Johnson S J, Hines JE, Burt AD. Phenotypic modulation of perisinusoidal cells following acute liver injury: a quantitative
15 analysis. Int. J. Exp. Path. 1992; 73: 765-772] oder chronischen [vgl. McLean E, McLean A, Sutton P. Instant Cirrhosis. An improved method for producing cirrhosis of the liver in rats by simultaneous administration of carbon tetrachloride and phenobarbitone. Br. J. Exp. Pathol. 1969; 50: 502-506] Tetrachlorkohlenstoff-induzierten Leberschädigung, das Modell der Leberfibrose durch Gallengangsligatur
20 [vgl. Kountouras J, Billing B, Scheuer P. Prolonged bile obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. Br. J. Exp. Pathol. 1984; 65: 305-311] oder die durch heterologes Serum induzierte Leberfibrose [vgl. Bhunchet E, Wake K. Suppression of experimental hepatic fibrosis by administration of vitamin A. Lab. Invest. 1985; 52: 182-194] verwendet werden. Auch andere Tiermodelle, bei denen
25 eine Leberfibrose auftritt, können zum Nachweis des antifibrotischen Effekts verwendet werden.

Je nach Organmanifestation oder Art der fibrotischen Schädigung können auch
30 Tiermodelle für andere Fibrosemanifestationen, z.B. im Herzen, in den Nieren, in den Lungen, in der Haut oder anderen Organen verwendet werden.

Die Reduktion der Collagenablagerung kann z.B. durch die Bestimmung des Hydroxyprolingehalts [vgl. Gerling B, Becker M, Waldschmidt J, Rehmann M, Schuppan D. Elevated serum aminoterminal procollagen type-III-peptide parallels collagen accumulation in rats with secondary biliary fibrosis. Hepatology 1996; 25: 79-84] der fibrotischen Organe oder durch quantitative Morphometrie erfolgen [vgl. Kauschke SG, Knorr A, Olzen M, Burchardt ER (1997) Expression of collagen (III) as determined by quantitative PCR and its correlation with extracellular collagen deposition in the rat CCl₄ model of liver fibrosis. Hepatology 26: 538A].

10

Abbildung 1 zeigt den Substratumsatz des DABCYL-EDANS-Dekapeptides durch rekombinante PCP in Abhängigkeit von der Zeit. Die Enzymaktivität wird in Anwesenheit von 100 nM Inhibitor fast vollständig inhibiert.

15

Abbildung 2 zeigt die Konzentrations-Wirkungsbeziehung des Phosphatininhibitors Z---PKF(PC)APC---O-Me

Abbildung 3 zeigt den Umsatz eines MMP-2 proteasespezifischen fluoreszenzmarkierten Substrats durch Metalloprotease Typ 2 in Abhängigkeit von der Zeit.

20

Die MMP-2 Enzymaktivität wird in Anwesenheit von 1 µM Z---PKF(PC)APC---O-Me nicht inhibiert.

a) Substrat: spontaner Zerfall von 50 µM Substrat in Testpuffer

b) APMA: APMA und 50 µM Substrat

25

c) MMP-2 inaktiv: MMP-2, nicht APMA-aktiviert und 50 µM Substrat

d) MMP/APMA: MMP-2, APMA-aktiviert und 50 µM Substrat

e) 1 µM Z---PKF(PC)APC---O-Me:

MMP-2, APMA-aktiviert und 50 µM Substrat

+ 1 µM Z---PKF(PC)APC---O-Me

30

Zur vorliegenden Erfindung gehören auch pharmazeutische Zubereitungen, die neben inerten, nicht-toxischen, pharmazeutisch geeigneten Hilfs- und Trägerstoffen eine oder mehrere Verbindungen der allgemeinen Formel (I) enthalten, oder die aus einem oder mehreren Wirkstoffen der Formeln (I) bestehen, sowie Verfahren zur Herstellung dieser Zubereitungen.

Die Wirkstoffe der Formeln (I) sollen in diesen Zubereitungen in einer Konzentration von 0,1 bis 99,5 Gew.-%, bevorzugt von 0,5 bis 95 Gew.-% der Gesamtmischung vorhanden sein.

Neben den Wirkstoffen der Formeln (I) können die pharmazeutischen Zubereitungen auch andere pharmazeutische Wirkstoffe enthalten.

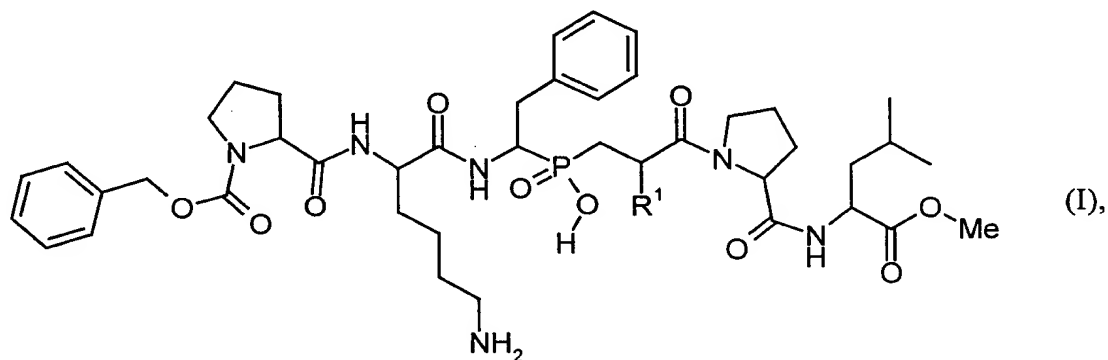
Die oben aufgeführten pharmazeutischen Zubereitungen können in üblicher Weise nach bekannten Methoden hergestellt werden, beispielsweise mit dem oder den Hilfs- oder Trägerstoffen.

Im allgemeinen hat es sich als vorteilhaft erwiesen, den oder die Wirkstoffe der Formeln (I) in Gesamtmengen von etwa 0,01 bis etwa 100 mg/kg, bevorzugt in Gesamtmengen von etwa 1 mg/kg bis 50 mg/kg Körpergewicht je 24 Stunden, gegebenenfalls in Form mehrerer Einzelgaben, zur Erzielung des gewünschten Ergebnisses zu verabreichen.

Es kann aber gegebenenfalls vorteilhaft sein, von den genannten Mengen abzuweichen, und zwar in Abhängigkeit von der Art und vom Körpergewicht des behandelten Individuums, vom individuellen Verhalten gegenüber dem Medikament, der Art und Schwere der Erkrankung, der Art der Zubereitung und Applikation, sowie dem Zeitpunkt bzw. Intervall, zu welchem die Verabreichung erfolgt.

Patentansprüche

1. Verwendung von Phosphinat-Peptidanaloga der allgemeinen Formel (I)



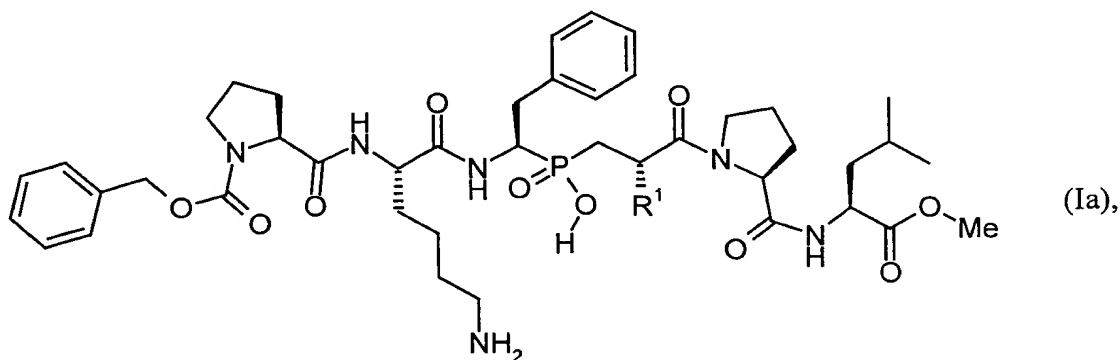
in welcher

R^1 für Wasserstoff oder Methyl steht,

10

und/oder deren Stereoisomeren und Salzen zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung von fibrotischen Erkrankungen.

2. Verwendung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß Verbindungen der allgemeinen Formel (I) mit der in der Formel (Ia) aufgezeigten Konfiguration



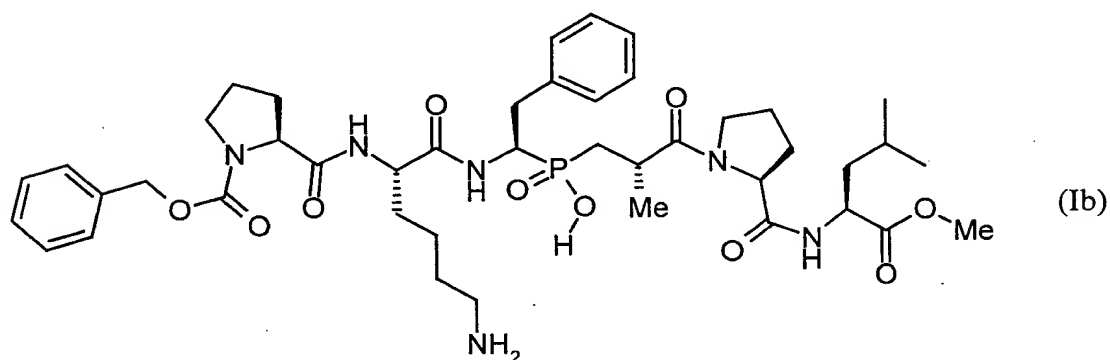
in welcher

R¹ für Wasserstoff oder Methyl steht,

und/oder deren Stereoisomere und Salze verwendet werden.

5

3. Verwendung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindung der Formel (Ib)



10

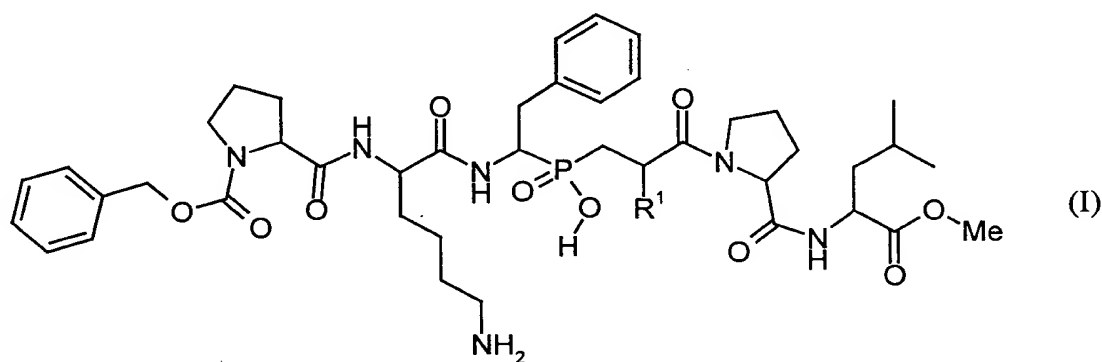
und/oder deren Enantiomere und Salze verwendet wird.

4. Verwendung gemäß Anspruch 1 zur Behandlung von Leberfibrose.

Phosphinat-Peptidanaloga zur Behandlung von fibrotischen Erkrankungen

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Phosphinat-Peptidanaloga der allgemeinen Formel (I)



als Inhibitoren der Procollagen-C-Proteinase (PCP) zur Behandlung fibrotischer Erkrankungen.

Abbildung 1

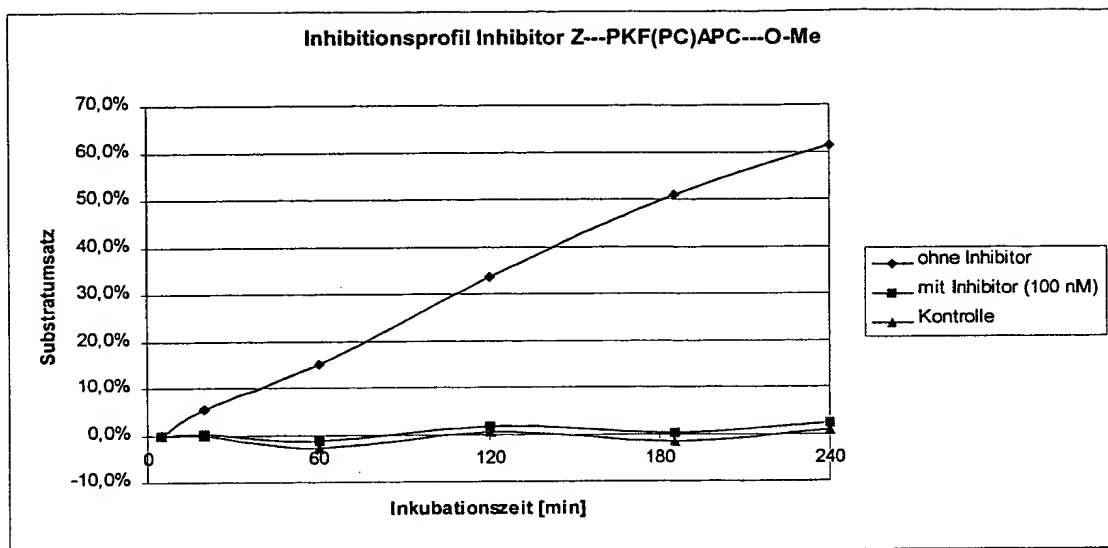


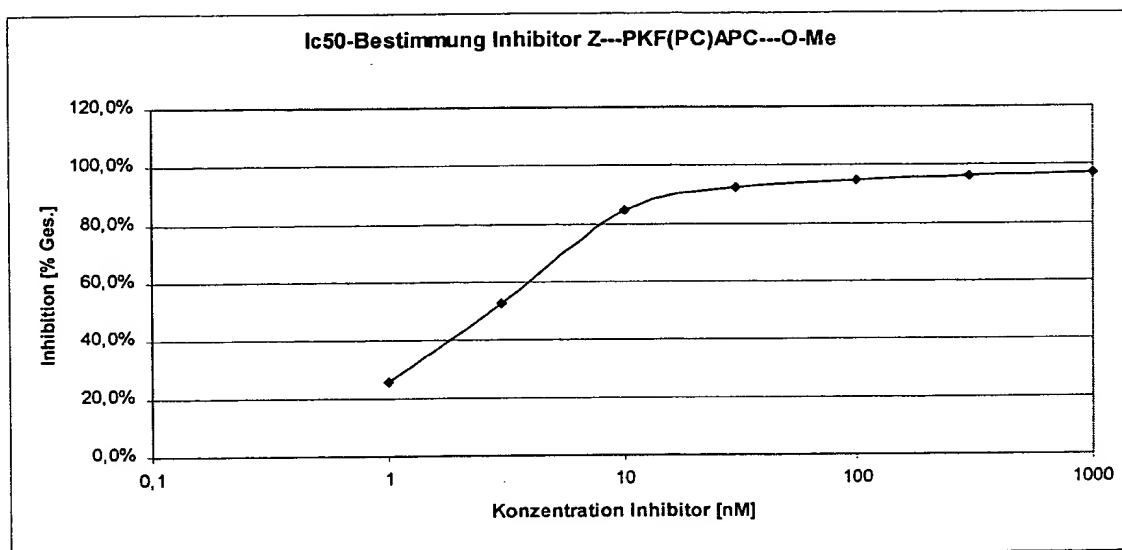
Abbildung 2

Abbildung 3

